

LIGASE/POLYMERASE METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATION IN DNA SAMPLES**Publication number:** DE10010281**Publication date:** 2001-09-06**Inventor:** OLEK ALEXANDER (DE); BERLIN KURT (DE)**Applicant:** EPIGENOMICS AG (DE)**Classification:****- international:** *G01N27/62; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N37/00; G01N27/62; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53; G01N37/00; (IPC1-7): C12Q1/68***- European:** C12Q1/68B6**Application number:** DE20001010281 20000225**Priority number(s):** DE20001010281 20000225**Also published as:**

WO0162961 (A1)

US2003119025 (A1)

EP1261740 (A0)

CA2401198 (A1)

Report a data error here**Abstract of DE10010281**

The invention relates to a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. Firstly, a genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, whereby 5-methylcytosine and cytosine react differently. Afterwards, the pretreated DNA is amplified while using a polymerase and at least one primer. In the next step, the amplified genomic DNA is hybridized to at least two oligonucleotides, whereby the latter are assembled by inserting at least one oligonucleotide. In the case of the ligation product, a nucleotide carries a detectable tagging, and the lengthening is subject to the methylation status of the respective cytosine in the genomic DNA sample. In the following step, the lengthened oligonucleotides are examined for the presence of the tagging.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 10 281 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68

②① Aktenzeichen: 100 10 281.6
②② Anmeldetag: 25. 2. 2000
②③ Offenlegungstag: 6. 9. 2001

DE 100 10 281 A 1

⑦① Anmelder:
Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10119 Berlin

⑦② Erfinder:
Olek, Alexander, 10115 Berlin, DE; Berlin, Kurt, Dr.,
14532 Stahnsdorf, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:

US 57 28 526 A
WO 99 67 414 A1

Rapid quantitation of methylation differences at
specific sites using methylation-sensitive single
nucleotide primer extension (Ms-SnuPE).

Gonzalgo,
M.L. & Jones, P.A., Nucleic Acid Res. (1997)25,
2529-2531;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Ligase/Polymerase-Verfahren zur Detektion von Cytosin-Methylierung in DNA Proben

⑤⑦ Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren, und anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Primer amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA an mindestens zwei Oligonukleotide hybridisiert, wobei letztere durch das Einfügen mindestens eines Oligonukleotids zusammengefügt werden. Bei dem Ligationsprodukt trägt ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung und die Verlängerung hängt vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe ab. Im nächsten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

DE 100 10 281 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern ist die Annahme naheliegend, daß pathogene Zustände sich in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms äußern.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Detektion des Methylierungszustandes genomischer DNA Proben. Das Verfahren kann gleichzeitig auch zum Nachweis von Punktmutationen und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) genutzt werden.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnick, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Es existieren verschiedene Verfahren um DNA zu immobilisieren. Das bekannteste Verfahren ist die Festbindung einer DNA, welche mit Biotin funktionalisiert ist, an eine Streptavidin-beschichtete Oberfläche (Uhlen, M. et al. 1988, Nucleic Acids Res. 16, 3025-3038). Die Bindungsstärke dieses Systems entspricht der einer kovalenten chemischen Bindung ohne eine zu sein. Um eine Ziel-DNA kovalent an eine chemisch vorbereitete Oberfläche binden zu können, bedarf es einer entsprechenden Funktionalität der Ziel-DNA. DNA selbst besitzt keine Funktionalisierung, die geeignet ist. Es gibt verschiedene Varianten, in eine Ziel-DNA eine geeignete Funktionalisierung einzuführen: Zwei leicht zu handhabende Funktionalisierungen sind primäre, aliphatische Amine und Thiole. Solche Amine werden quantitativ mit N-Hydroxysuccinimidestern umgesetzt, und Thiole reagieren unter geeigneten Bedingungen quantitativ mit Alkylidenen. Eine Schwierigkeit besteht im Einführen einer solchen Funktionalisierung in eine DNA. Die einfachste Variante ist die Einführung durch einen Primer einer PCR. Gezeigte Varianten benutzen 5'-modifizierte Primer (NH₂ und SH) und einen bifunktionalen Linker.

Ein wesentlicher Bestandteil der Immobilisierung auf einer Oberfläche ist ihre Beschaffenheit. Bis jetzt beschriebene Systeme sind hauptsächlich aus Silizium oder Metall. Eine weitere Methode zur Bindung einer Ziel-DNA basiert darauf, eine kurze Erkennungssequenz (z. B. 20 Basen) in der Ziel-DNA zur Hybridisierung an ein oberflächenimmobilisiertes Oligonukleotid zu verwenden. Es sind auch enzymatische Varianten zur Einführung von chemisch aktivierten Positionen an eine Ziel-DNA beschrieben worden. Hier wird an einer Ziel-DNA enzymatisch eine 5'-NH₂-Funktionalisierung durchgeführt.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligo-

mer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.

Neuere Verfahren zum Nachweis von Mutationen sind im folgenden aufgeführt:

Als ein Spezialfall der Sequenzierung ist die Einzelbasen-Primer-Erweiterung (Genetic Bit Analysis) erwähnenswert (Head, SR., Rogers, YH., Parikh K., Lan, G., Anderson, S., Goelet, P., Boycejacino MT., Nucleic Acids Research. 25(24): 5065-5071, 1997; Picoult-Newberg, L., Genome Res. 9(2): 167-174, 1999). Eine kombinierte Amplifikation und Sequenzierung wird in US-Patent 5928906 beschrieben, wo eine basenspezifische Terminierung auf Matrixmolekülen eingesetzt wird. Ein weiteres Verfahren setzt eine Ligase/Polymerasereaktion für die Identifikation von Nukleotiden ein (US-Patent 5952174).

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60 : 2299-2301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

Maldi eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1 : 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlerweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23 : 1367-1373). Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von "charge tagging" ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referen-

zen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Gemeinsamkeiten zwischen Promotoren bestehen nicht nur im Vorkommen von TATA- oder GC-Boxen sondern auch darin, für welche Transkriptionsfaktoren sie Bindestellen besitzen und in welchem Abstand diese sich zueinander befinden. Die existierenden Bindestellen für ein bestimmtes Protein stimmen in ihrer Sequenz nicht vollständig überein, es finden sich aber konservierte Folgen von mindestens 4 Basen, die durch das Einfügen von "Wobbles", d. h. Positionen, an denen sich jeweils unterschiedliche Basen befinden, noch verlängert werden können. Des weiteren liegen diese Bindestellen in bestimmten Abständen zueinander vor.

Die Verteilung der DNA im Interphase-Chromatin, das den größten Teil des nuklearen Volumens einnimmt, unterliegt jedoch einer ganz speziellen Ordnung. So ist die DNA an mehreren Stellen an die nukleare Matrix, eine filamentöse Struktur an der Innenseite der nuklearen Membran, angeheftet. Diese Regionen bezeichnet man als matrix attachment regions (MAR) oder scaffold attachment regions (SAR). Das Anheften hat wesentlichen Einfluß auf die Transkription bzw. die Replikation. Diese MAR-Fragmente weisen keine konservativen Sequenzen auf, bestehen allerdings zu 70% aus A bzw. T und liegen in der Nähe von cisagierenden Regionen, die die Transkription allgemein regulieren, und Topoisomerase II-Erkennungsstellen.

Neben Promotoren und Enhancern existieren weitere regulatorische Elemente für verschiedene Gene, sogenannte Insulators. Diese Insulators können z. B. die Wirkung des Enhancers auf den Promotor inhibieren, wenn sie zwischen Enhancer und Promotor liegen, oder aber, zwischen Heterochromatin und einem Gen gelegen, das aktive Gen vor dem Einfluß des Heterochromatins schützen. Beispiele für solche Insulators sind: 1. sogenannte LCR (locus control regions), welche aus mehreren gegenüber DNAase I hypersensitiven Stellen besteht; 2. bestimmte Sequenzen wie SCS (specialized chromatin structures) bzw. SCS', 350 bzw. 200 bp lang und hoch-resistent gegen Degradierung durch DNAase I und auf beiden Seiten von hypersensitiven Stellen flankiert (Abstand je 100 bp). An scs' bindet das Protein BEAF-32. Diese Insulators können auf beiden Seiten des Gens liegen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ein Verfahren bereitzustellen, welches sich zum gleichzeitigen Detektieren von Cytosin-Methylierungen und SNPs in genomischen DNA-Proben besonders eignet. Dabei soll bevorzugt eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig untersucht werden können.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben gelöst, wobei man die folgenden Schritte ausführt:

- (a) man setzt eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;
- (b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Oligonukleotid (Typ A) als Primer;
- (c) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus verschiedenen Spezies des Typs B und des Typs C besteht und wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide des Typs B mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind

und wobei das zweite Oligonukleotid (Typ C) an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des ersten hybridisierten Oligonukleotids (Typ B) an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

(d) man verlängert das Oligonukleotid (Typ B) mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 2 V-Ende des Oligonukleotids des Typs B und dem 5-Ende des Oligonukleotids des Typs C liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

(e) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte erste Oligonukleotid des Typs B und das zweite Oligonukleotid des Typs C verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids des Typs B derart erfolgte, dass nun das 2 V-Ende mit vorhandener 2 V-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C angrenzt;

(f) man detektiert, ob sich ein Ligationsprodukt gebildet hat.

Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass das 5'-Ende des ersten Oligonukleotids (Typ B) an eine Festphase immobilisiert ist oder dass das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) an eine Festphase immobilisiert ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, dass man die in Schritt b erzeugten Amplifikate an definierten Stellen an eine Festphase bindet. Besonders bevorzugt ist dabei, dass man bei der Amplifikation mindestens einen Primer (Typ A) an eine Festphase bindet.

Es ist weiterhin bevorzugt, dass man unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.

Ferner ist bevorzugt, dass man unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.

Bevorzugt ist auch, dass die an den verlängerten Oligonukleotiden angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

Erfindungsgemäß ist weiterhin bevorzugt, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

Ganz besonders bevorzugt ist es, dass die man Behandlung der DNA vor der Amplifikation mit einer Bisulfittlösung (= Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist auch, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt.

Bevorzugt ist ferner, dass die verwendeten Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten und/oder dass die verwendeten Oligonukleotide des Typs B und/oder des Typs C entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

Besonders bevorzugt ist ferner, dass man die Ligationsprodukte und/oder die Verlängerungsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht. Dabei ist insbesondere bevorzugt, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind oder dass die Markierungen Radionuklide sind oder dass die Markierungen ablösbare Massen-

markierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.

Bevorzugt ist dabei auch, dass die verlängerten Oligonukleotide und Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweisbar sind und somit durch ihre Masse eindeutig markiert sind. Ferner ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass jeweils ein Fragment der verlängerten und/oder ligierten Oligonukleotide im Massenspektrometer nachweisbar ist.

Weiterhin ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt, dass man das Fragment durch Verdau mit einer oder mehreren Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

Besonders bevorzugt ist hierbei, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren ist ferner erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die Detektion der verlängerten Oligonukleotide und/oder der Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

Bevorzugt ist auch ein Verfahren, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen und/oder die Ligasen thermostabile Ligasen sind.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren, wobei man zusätzlich zur DNA-Methylierung auch SNPs detektiert und visualisiert.

Auch ist ein Verfahren bevorzugt, wobei die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ D 2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ D 1) sind. Hierbei ist insbesondere bevorzugt, dass das kettenterminierende Nukleotid (Typ D 2) aus einer Gruppe ausgewählt wird, die entweder die Basen T und C oder aber die Basen G und A enthält und/oder die kettenverlängernden Nukleotide (Typ D 1) aus einer Gruppe ausgewählt wird, die entweder die Nukleobasen A, T und C oder aber die Basen G und A und T enthält.

Bevorzugt ist auch, dass das fluoreszenzmarkierte dCTP-Derivat Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.

Ganz besonders bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, wobei in Schritt a) die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.

Es ist außerdem erfindungsgemäß bevorzugt, dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxyadenosin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxyguanosin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt und/oder dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxyguanosin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxyadenosin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt und/oder dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid Thymidin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxycytidin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt und/oder dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxycytidin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in

Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxythymidin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt.

Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man Methylierungsanalysen des oberen und unteren DNA-Stranges gleichzeitig durchführt.

Bevorzugt ist schließlich ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei man die Schritte c-e in Lösung durchführt und die ligierten Oligonukleotide auf eine Festphase für die Detektion aufbringt.

Beschrieben wird also ein Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin in genomischen DNA-Proben:

Die Methode beinhaltet die Amplifikation, Hybridisierung und Verlängerungsreaktion einer gesamten DNA oder eines Fragments hiervon. Die Methode kann benutzt werden zum Nachweis von Methylcytosin und auch gleichzeitig von Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) und Mutationen.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Im ersten Schritt des Verfahrens behandelt man die eingesetzte DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) oder aber einer anderen Chemikalie derart, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosinbasen so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Verwendet man Bisulfit, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Die anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Die eingesetzte genomische DNA fragmentiert man bevorzugt vor der chemischen Behandlung mit einer Restriktionsendonuklease.

Im zweiten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die vorbehandelte DNA bevorzugt unter Verwendung einer hitzebeständigen Polymerase und mindestens einem Primer (Typ A). Dieser Primer kann bevorzugt 10-40 Basenpaare enthalten.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation mit Primern des Typs A mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation von mehreren DNA-Fragmenten in einem Reaktionsgefäß durch. Dies kann entweder eine sogenannte Multiplex PCR sein, in der verschiedene Primer jeweils definierte Fragmente erzeugen. Man führt verschiedene definierte Amplifikationen in einem Reaktionsgefäß durch. In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens amplifizieren Primer gezielt und reproduzierbar jeweils mehrere Fragmente. Dies erzielt man beispielsweise dadurch, dass die Fragmente beispielsweise an repetitive Elemente im Genom binden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens binden die Primer an Transcription Factor Binding Sites, an Promotoren oder andere regulatorische Elemente in Genen. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens findet die Amplifikation durch Verlängerung von Primern statt, die an eine Festphase gebunden sind. Eine Multiplex-PCR im weiteren Sinne kann man dadurch ausführen, dass unterschiedliche Primer an verschiedenen, definierten Orten einer Festphase gebunden sind. Bei diesen Ausführungen der Amplifikation ist immer jeweils der zu einem Strang komplementäre Primer (z. B. Forward-Primer) immobilisiert und der jeweils zum Gegenstrang komplementäre Primer (z. B. Reverse-Primer) liegt in Lösung vor.

In einer wiederum bevorzugten Variante des zweiten Ver-

fahrensschrittes ist die Festphase eben, wobei die unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Das hat zur Folge, dass auch die unterschiedlichen Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Wie bereits oben beschrieben, werden in diesem Fall mehrere Amplifikate direkt auf der Festphase erzeugt.

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens enthalten die Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder nur die Basen T, A und G.

Im dritten Schritt des Verfahrens hybridisiert man einen Satz von Oligonukleotiden, bestehend aus zwei Typen von Oligonukleotiden, einem ersten (Typ B) und einem zweiten (Typ C) Oligonukleotid an eine ausgewählte Position der amplifizierten genomischen DNA. Das erste Oligonukleotid (Typ B) ist ein Primer, der an eine erste Region der zu untersuchenden Zielsequenz derart hybridisiert, dass dessen 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzt, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind. Das zweite Oligonukleotid (Typ C) hybridisiert an eine zweite Region des Zielmoleküls, so dass das 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotids oder von bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des ersten hybridisierten Oligonukleotids (Typ B) an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist.

Die an die Amplifikate hybridisierten Oligonukleotide des Typs B können mit ihrem 5'-Ende oder an einer anderen Base oder über ihr Rückgrat mit einer Festphase verbunden sein, nicht aber über ihr 3'-Ende. Bevorzugt erfolgt eine Bindung über das 5'-Ende. In einer bevorzugten Variante ist die Festphase eben, wobei die unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen (Typ B) in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

Die an die Amplifikate hybridisierten Oligonukleotide des Typs C können mit ihrem 3'-Ende oder an einer anderen Base oder über ihr Rückgrat mit einer Festphase verbunden sein, nicht aber über ihr 5'-Ende. Bevorzugt erfolgt eine Bindung über das 3'-Ende. In einer bevorzugten Variante ist die Festphase eben, wobei die unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen (Typ C) in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Das 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C muss phosphoryliert sein.

Zusammenfassend bestehen für die Immobilisierung an eine Festphase vorzugsweise die folgenden verschiedenen Möglichkeiten:

1. Das 5'-Ende des ersten Oligonukleotids (Typ B) ist an eine Festphase immobilisiert.
2. Das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) ist an eine Festphase immobilisiert.
3. Die Amplifikation wird bereits auf einer Festphase durchgeführt, dabei ist bevorzugt das 5'-Ende eines Primers mit der Festphase verbunden.
4. Man führt die Amplifikation, Hybridisierung, Verlängerungsreaktion und Ligation vorzugsweise in Lösung durch und bringt erst das Ligationsprodukt für die Detektion auf die Festphase auf.

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens

enthalten die Oligonukleotide des Typs B und/oder des Typs C entweder nur die Basen T, A und C oder nur die Basen T, A und G.

Das Oligonukleotid (Typ B) mit bekannter Sequenz von n Nucleotiden wird im vierten Verfahrensschritt mit einer hitzebeständigen Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids des Typs B und dem 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C liegen. Bevorzugt trägt dabei zumindest ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens trägt entweder das Oligonukleotid des Typs B oder das Oligonukleotid des Typs C eine nachweisbare Markierung. Die Art der Verlängerung hängt dabei vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe ab, oder aber von eventuell vorhandenen SNPs, Punktmutationen oder Deletionen, Insertionen und Inversionen.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ D2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ D1). Dabei ist das terminierende Nukleotid (Typ D2) ein 2',3'-Didesoxynukleotid und das kettenverlängernde Nukleotid ein 2'-Desoxynukleotid. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wählt man die Nucleobasen des Typs D1 aus einer Gruppe aus, die die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten. In einer weiteren, besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wählt man die Nucleobasen des Typs D2 aus einer Gruppe aus, die entweder die Basen T und C oder aber die Basen G und A enthält.

Die Markierung der verlängerten Oligonukleotide des Typs B erfolgt bevorzugt über absorbierende Farbstoffe und/oder über Chemilumineszenz und/oder über radioaktive Isotope und/oder über Fluoreszenzmarkierungen, die über die im vierten Verfahrensschritt angefügten Nukleotide oder aber über die Oligonukleotide des Typs B oder C eingeführt werden. Grundsätzlich trägt im Falle der Markierung der Oligonukleotide das immobilisierte Oligonukleotid keine Markierung. Bevorzugt ist ebenfalls die Markierung über die Molekülmasse des verlängerten und ligierten Oligonukleotids.

Diese hybridisierten Oligonukleotide werden im fünften Verfahrensschritt in Gegenwart einer bevorzugt thermostabilen Ligase inkubiert, um das angrenzende hybridisierte erste (Typ B) und zweite (Typ C) Oligonukleotid zu verbinden und dadurch ein Ligationsprodukt zu erhalten, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids derart erfolgte, dass nun ein Desoxynukleosid unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C angrenzt.

Im sechsten Verfahrensschritt wird detektiert, ob sich ein Ligationsprodukt gebildet hat. Dazu werden die verlängerten Oligonukleotide an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, auf das Vorhandensein einer Markierung untersucht.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt der Nachweis der verlängerten Oligonukleotide über ihre Fluoreszenz. Dabei haben bevorzugt unterschiedliche Ligationsprodukte unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften, was beispielsweise durch mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte eingebaute Nukleotide erzielt werden kann.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens erzeugt man Fragmente des verlängerten Oligonukleotids durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.

Ablösbare Massenmarkierungen, die verlängerten Oligo-

nukleotide insgesamt oder Fragmente hiervon werden in einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens mittels Matrix-assistierter Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) oder mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI) anhand ihrer eindeutigen Masse nachgewiesen und visualisiert.

Vorzugsweise weisen die im Massenspektrometer detektierten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens analysiert man SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in einem Experiment.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens analysiert man den unteren und den oberen Strang der DNA-Probe nach der chemischen Vorbehandlung in einem Experiment, um eine interne experimentelle Kontrolle sicherzustellen.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, das Chemikalien und Hilfsmittel zur Durchführung der Bisulfat-Reaktion und/oder der Amplifikation, der Hybridisierung, der Verlängerungsreaktion und der Ligasereaktion und/oder Polymerasen und/oder die Dokumentation zur Durchführung des Verfahrens enthält.

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment von Exon 23 des Faktor VIII-Gens, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung zu untersuchen ist.

Im ersten Schritt wird das Fragment durch Primer des Typs A amplifiziert und zwar durch
ATTATGTTGGAGTAGTAGAGTTTAAATGGTT und
ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT.

Die amplifizierte DNA wird an ein Oligonukleotid des Typs B (beispielsweise ATGTTGGATGTTGTTGAG) und 5'-phosphoryliertes Oligonukleotid des Typs C (beispielsweise GTATAAAGTAAATTAGAAGGAAGAT) hybridisiert. Anschliessend wird die Verlängerungsreaktion mit 2',3'-Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP, als Typ D2), Thymidintriphosphat (dTTP, als Typ D1) und 2-Desoxyadenosintriphosphat (dATP, als Typ D1) durchgeführt. Es entsteht, wenn ein methyliertes Cytosin vorlag, das Verlängerungsprodukt ATGTTGGATGTTGTTGAGAAAC, welches am 3'-Ende keine Hydroxyfunktion trägt, während bei Vorliegen eines nicht methylierten Cytosins in der zu untersuchenden Sequenz das Verlängerungsprodukt ATGTTGGATGTTGTTGAGAAAT mit einer 3'-OH-Funktion entsteht. In der nun folgenden Ligationsreaktion kann daher nur das Ligationsprodukt ATGTTGGATGTTGTTGAGAAAT ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT gebildet werden. Ist das Oligonukleotid des Typs C ACTTAACACTTACTATTTAAATCACAACCCAT nun fluoreszenzmarkiert, so wird nur dann eine fluoreszierende Markierung eingebaut, wenn ein nicht methyliertes Cytosin in der zu untersuchenden DNA-Probe vorgelegen hat.

Umgekehrt kann eine Kontrolle unter Verwendung der gleichen Sequenzen, jedoch mit einem veränderten Satz von Triphosphaten durchgeführt werden. Wird analog dem obigen Beispiel in der Verlängerungsreaktion 2',3'-Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP, als Typ D2), 2-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, als Typ D1) und 2'-Desoxyadenosintriphosphat (dATP, als Typ D1) durchgeführt, so ergibt sich nach der Ligasereaktion umgekehrt nur dann ein Einbau einer Markierung, wenn ein methyliertes Cytosin in der zu untersuchenden DNA-Probe vorgelegen hat.

Patentsprüche

1. Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben, dadurch gekennzeichnet,

dass man die folgenden Schritte ausführt:

- (a) man setzt eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;
 - (b) man amplifiziert die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase und mindestens einem Oligonukleotid (Typ A) als Primer;
 - (c) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus verschiedenen Spezies des Typs B und des Typs C besteht und wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide des Typs B mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid (Typ C) an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des ersten hybridisierten Oligonukleotids (Typ B) an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;
 - (d) man verlängert das Oligonukleotid (Typ B) mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids des Typs B und dem 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
 - (e) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte erste Oligonukleotid des Typs B und das zweite Oligonukleotid des Typs C verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids des Typs B derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids des Typs C angrenzt;
 - (f) man detektiert, ob sich ein Ligationsprodukt gebildet hat.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das 5'-Ende des ersten Oligonukleotids (Typ B) an eine Festphase immobilisiert ist.
 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das 3'-Ende des zweiten Oligonukleotids (Typ C) an eine Festphase immobilisiert ist.
 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die in Schritt b erzeugten Amplifikate an definierten Stellen an eine Festphase bindet.
 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man bei der Amplifikation mindestens einen Primer (Typ A) an eine Festphase bindet.
 6. Verfahren nach Anspruch 1, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass man unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.
 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, da-

durch gekennzeichnet, dass man unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters anordnet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die an den verlängerten Oligonukleotiden angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die man Behandlung der DNA vor der Amplifikation mit einer Bisulfatlösung (= Disulfit, Hydrogensulfit) durchführt.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt.
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Oligonukleotide des Typs A entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Oligonukleotide des Typs B und/oder des Typs C entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Ligationsprodukte und/oder die Verlängerungsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht.
15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die verlängerten Oligonukleotide und Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweisbar sind und somit durch ihre Masse eindeutig markiert sind.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils ein Fragment der verlängerten und/oder ligierten Oligonukleotide im Massenspektrometer nachweisbar ist.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment durch Verdau mit einer oder mehreren Exo- oder Endonukleasen erzeugt.
21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
22. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion der verlängerten Oligonukleotide und/oder der Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche

che, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen und/oder die Ligasen thermostabile Ligasen sind.

24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei man zusätzlich zur DNA-Methylierung auch SNPs detektiert und visualisiert. 5

25. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die eingesetzten Nukleotide terminierende (Typ D 2) und/oder kettenverlängernde Nukleotide (Typ D 1) sind. 10

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das kettenterminierende Nukleotid (Typ D 2) aus einer Gruppe ausgewählt wird, die entweder die Basen T und C oder aber die Basen G und A enthält.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, wobei die kettenverlängernden Nukleotide (Typ D 1) aus einer Gruppe ausgewählt wird, die entweder die Nukleobasen A, T und C oder aber die Basen G und A und T enthält.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass das fluoreszenzmarkierte dCTP-Derivat Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP ist. 20

29. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt. 25

30. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt a) die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirnrückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfaßt. 30

31. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxyadenosin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxyguanosin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt. 40

32. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxyguanosin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxyadenosin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt. 45

33. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid Thymidin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxycytidin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt. 50

34. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man das 3'-Ende des in Schritt d verlängerten Oligonukleotids des Typs B durch das Nukleotid 2'-Desoxycytidin bildet, das durch seine 3'-Hydroxyfunktion die Ligation in Schritt e ermöglicht, wohingegen ein 2',3'-Didesoxythymidin am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht zu einem Ligationsprodukt führt. 60

35. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dass man Methylierungsanalysen des oberen und unteren DNA-Stranges gleichzeitig durchführt. 65

36. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Schritte c-e in Lösung durchführt und die ligierten Oligonukleotide auf eine Festphase für die Detektion aufbringt.